

Jämförelse mellan okulär och molekylär diagnostisering av stråbassjukdomar i höstvete

Agnes Radovic



Självständigt arbete • 15 hp

Uppsala 2019

Jämförelse mellan okulär och molekylär diagnostisering av stråbassjukdomar i höstvet

Agnes Radovic

Handledare:	Anna Berlin, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi
Bitr. handledare:	Eva Edin, Hushållningssällskapet Västmanland Björn Andersson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi
Examinator:	Hanna Friberg, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi
Omfattning:	15 hp
Nivå och fördjupning:	Grundnivå, G2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i Biologi
Kursansvarig inst.:	Institutionen för vatten och miljö
Kurskod:	EX0894
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2019
Omslagsbild:	Agnes Radovic
Elektronisk publicering:	https://stud.epsilon.slu.se
Nyckelord:	<i>Oculimacula yallundae</i> , <i>Oculimacula acuformis</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizictonia cerealis</i> , PCR, stråbassjukdomar

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap
Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi

Sammanfattning

I dagens jordbruk baseras diagnoser och rekommendationer kring kemisk bekämpning till stor del på okulär diagnostisering gjord i fält. Den okulära diagnostiseringen är ett bra verktyg, men i vissa fall är det svårt att se skillnad på liknande symtom orsakade av olika patogener. Ett sådant fall är stråbassjukdomarna: stråknäckare orsakad av *Oculimacula* spp., skarp ögonfläck orsakad av *Rhizoctonia cerealis* och stråbasröta orsakad av *Fusarium* spp. Stråbassjukdomar är idag inte ett stort problem i Sverige, men kan i framtiden bli ett större problem. På grund av detta behövs det ett effektivt sätt att diagnostisera dessa sjukdomar. Syftet med rapporten är att jämföra okulär och molekyllär diagnostisering av dessa sjukdomar.

Prover som diagnostiserats okulärt har i det här arbetet genomgått en molekyllär diagnostisering i form av en PCR-analys. Resultaten jämfördes med varandra för att se hur bra metoderna stämde överens.

Till undersökningarna användes prover från ett fält i Skåne och ett i Uppland, från vilka individuellt graderade strån undersökts. Resultatet visar att det finns skillnad mellan fälten gällande hur god samstämmigheten var mellan den okulära diagnosen och den molekyllära diagnosen. I fältet i Skåne stämde inte diagnoserna med varandra i 63% av fallen då det var en överdiagnostisering, dvs fler strån graderades som sjuka än vad PCR-analysen visade positivt resultat för svampen, vid den okulära diagnostiseringen. Den okulära- och molekyllära diagnostiseringen från fältet i Uppland stämde inte överens i 28% av fallen, även där på grund av en överdiagnostisering i den okulära diagnosen.

Beroende på sjukdom varierade det om det över- eller underdiagnostiserats. Stråbasröta orsakad av *Fusarium* spp. hade flest felgraderingar, sjukdomen verkar därmed vara svårast att okulärt diagnostisera och var överdiagnostiserad i båda fälten. Symtom orsakade av *Fusarium* spp. kan dock förväxlas med symtom av *Microdochium* spp. som det inte testades för i PCR-analysen i detta arbete. I Skåne överdiagnostiserades 39% av de undersökta stråna för stråbasröta orsakad av *Fusarium* spp. och i Uppland 18% av stråna.

Två arter som orsakar stråknäckare, *Oculimacula yallundae* och *Oculimacula acutiformis*, testades med hjälp av PCR-analys. Andelen ej överensstämmande diagnoser var 20% i Uppland och 26% i Skåne. Av resultaten från PCR-analysen framgår det att *O. acutiformis* hade högre förekomst i fältet i Skåne än fältet i Uppland.

Skarp ögonfläck orsakad av *Rhizoctonia cerealis* visade inga synliga symtom i Uppland. I den molekyllära diagnostiseringen detekterades ett smittat strå, vilket gav en underdiagnostisering på 3%. I proverna från Skåne var det en viss överdiagnostisering och 18% av diagnoserna stämde inte överens med den molekyllära undersökningarna.

Skillnaden mellan de okulära- och de molekylära diagnoserna beror till stor del på en överdiagnostisering. Det kan delvis bero på att de olika sjukdomarna har liknande symtom, men även av att vissa av symtomen kan vara orsakade av fysiologiska skador. En annan orsak kan vara primrarna som användes vid den molekylära diagnosen. Beroende på hur artspecifika och känsliga primrarna är kan de ge en felaktig uppfattning. Även tolkningen av det molekylära resultatet kan leda till felbedömningar. För att få en god diagnostisering bör man använda sig av båda metoderna. Den okulära diagnostiseringsmetoden är viktig då den är lättillgänglig och tidseffektiv och oftast är det den enda möjliga diagnostiseringsmetoden. En kombination av båda, speciellt när man skapar eller omvärderar bekämpningströsklar och lär sig att göra en okulär analys, rekommenderas.

Nyckelord: Oculimacula yallundae, Oculimacula acuformis, Fusarium spp., Rhizoctonia cerealis, PCR, stråbassjukdomar

Abstract

In today's agricultural system, diagnoses and recommendations for pesticide treatments are often based on ocular diagnosis made in the field. The ocular diagnosis is a good tool, but in some cases, is it difficult to distinguish similar looking symptoms caused by different pathogens.

An example of this are the stem-base diseases: eyespot (*Oculimacula* spp.), sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) and foot rot caused by *Fusarium* spp. Stem-based diseases are not a major problem in Sweden but can become problematic in the future. Because of this, an efficient method to diagnose the diseases is needed.

The purpose of this study is to compare ocular diagnosis with the molecular diagnosis of these diseases. Samples that were previously ocular diagnosed were in this project molecular diagnosed based on a PCR-analysis. The results were compared to determine how good the methods agreed with each other.

Samples from one field in Skåne and one in Uppland were used. Each straw was examined, and diseases assessed. The result shows that there was a difference between the fields regarding the consensus between the ocular diagnosis and the molecular diagnosis. The ocular and molecular diagnosis in the field in Skåne did not correspond with each other in 63% of the straws due to overdiagnosis of diseases in the ocular diagnosis. A higher number of straws were assessed as sick in the ocular diagnosis compared with the molecular method. The ocular and molecular diagnosis from the field in Uppland did not agree in 28% of the cases, also in this case due to overdiagnosis in the ocular diagnosis. Depending on the plant disease, it varied whether it was over- or underdiagnosed, and how much.

Foot rot caused by *Fusarium* spp. is difficult to diagnose and was overdiagnosed in both fields. However, symptoms of *Fusarium* spp. are easy to confuse with those of *Microdochium* spp., which was not tested for in the PCR-assay. In Skåne, 39% of the studied straws were overdiagnosed for foot rot caused by *Fusarium* spp., and in Uppland 18% of the straws were overdiagnosed.

Two different species causing eyespot, *Oculimacula yallundae*, and *Oculimacula acuformis*, were tested by PCR-analysis. In Uppland, 20% of the diagnoses did not match between the ocular and molecular diagnosis and for Skåne the number was 26%. The PCR-results showed that *O. acuformis* was present in a higher proportion of the samples from the field in Skåne than in the field in Uppland. Eyespot caused by *Rhizoctonia cerealis* showed no visible symptoms in Uppland. In the molecular diagnosis, one infected straw was detected, resulting in a 3% underdiagnosis. In the samples from Skåne, there was a tendency of overdiagnosis and 18% of the diagnoses did not match.

The difference in ocular and molecular diagnosis was often due to overdiagnosis. This may partly be because the different diseases have similar symptoms, but also

because some of the symptoms may be due to physiological damage. Another reason may be the primers used in the molecular diagnosis assay. Depending on how species-specific and sensitive the primers are, they may give an incorrect result. The interpretation of the molecular result can also lead to a misjudgment of the result. To get an accurate diagnosis, both methods should be used. The ocular diagnostic method is important as it is available at all times and is time efficient. A combination of both, especially when updating the thresholds for pesticide application and learning how to make an ocular analysis, is recommended.

Keywords: *Oculimacula yallundae*, *Oculimacula acuformis*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia cerealis*, PCR, stem-base diseases

Innehållsförteckning

Inledning	6
1.1 Syfte och frågeställning	6
2 Bakgrund	7
2.1 Patogenerna och deras sjukdomsbilder	7
2.1.1 Stråknäckare orsakad av <i>Oculimacula acuformis</i> och <i>Oculimacula yallundae</i>	7
2.1.2 Skarpögonfläck orsakad av <i>Rhizoctonia cerealis</i>	8
2.1.3 Stråbasröta orsakad av <i>Fusarium</i> spp.	10
2.1.4 Jämförelse mellan stråbassjukdomar	11
2.2 Okulär diagnostisering jämfört med molekylär detektion	11
3 Material och metoder	13
3.1 Diagnostisering av stråbassjukdomar	13
3.1.1 Provmaterial	13
3.1.2 Väderförhållanden under odlingssäsongen	13
3.2 Okulär identifiering av sjukdomssymtom	14
3.3 Molekylär detektion	14
3.4 Statistik analys	16
4 Resultat	17
4.1 Stråknäckare orsakad av <i>Oculimacula</i> spp.	17
4.2 Skarp ögonfläck orsakad av <i>Rhizoctonia cerealis</i>	19
4.3 Stråbasröta orsakad av <i>Fusarium</i> spp.	20
4.4 Jämförelse mellan de olika sjukdomarna och diagnosmetoderna	21
5 Diskussion	23
5.1 Pearsons χ^2 - test och jämförelse mellan okulär och molekylär detektion	23
5.2 Över- och underdiagnostisering	24
5.3 Svagheter med undersökningen	26
5.4 Slutsats	27
Referenslista	28
Tack	30
Bilaga 1 – Tabeller över jämförelsen av de okulär och molekylära resultaten	32

Inledning

Ståbassjukdomar i vete är idag inte ett stort problem i det svenska jordbruket, men det finns tecken på att förekomst av angrepp ökar. Okulär diagnosticering av olika stråbassjukdomar är svår eftersom deras symtom är mycket lika varandra och det är svårt att skilja dem åt i fält. Då hotet ökar krävs det en bra diagnostiseringsteknik som fungerar effektivt och ger säkra resultat.

1.1 Syfte och frågeställning

En korrekt diagnostisering behövs för att utveckla en anpassad bekämpning och för ha bra översikt av sjukdomsbilden av stråbassjukdomar i Sverige. Syftet med den här studien är att jämföra okulär och molekylär diagnostisering av stråbassjukdomar.

De stråbassjukdomar som har jämförts är stråknäckare (orsakad av *Oculimacula yallundae* och *Oculimacula acuformis*), skarp ögonfläck (orsakad av *Rhizoctonia cerealis*) och stråbasröta orsakad av *Fusarium* spp. De fyra patogenerna ger upphov till liknande symtom och kan vara svåra att skilja åt. Detta är grunden till arbetet vars frågeställning är att jämföra okulär med molekylär diagnostisering och se hur bra de stämmer överens.

2 Bakgrund

2.1 Patogenerna och deras sjukdomsbilder

2.1.1 Stråknäckare orsakad av *Oculimacula acuformis* och *Oculimacula yallundae*

Stråknäckare orsakas av två arter, *Oculimacula acuformis* och *O. yallundae*. I fält skiljer man inte på stråknäckare orsakad av *O. acuformis* och *O. yallundae* då symtomen är för lika. Både *O. acuformis* och *O. yallundae* angriper höstvet och annan höstsäd. *Oculimacula yallundae* kallas typ W då den först och främst går på vete. *Oculimacula acuformis* kallas typ R, då den främst infekterar råg och korn, men båda svamparna angriper även andra sorters gräs inom Poaceae (Ramanauskienė *et al.* 2016). I fält förekommer de ofta samtidigt och man hittar sällan endast ena arten.

Både *O. acuformis* och *O. yallundae* har liknande livscyklar. De är ascomycota svampar. De är heterotalliska och behöver olika parningstyper för att kunna föröka sig sexuellt. Ascosporer kan spridas lång väg med vinden. När ascosporeerna kommer i kontakt med unga plantor infekteras de, oftast på hösten. Det tar 6–8 veckor innan symtomen syns och på höstvet syns symtom oftast inte förrän på våren. Symtomen består av runda fläckar vid stråbasen, fläckarna växer inåt i plantan och stryper näringsupptaget. Konidier bildas sedan i halmrester och sprids under milda vintrar eller tidig vår. Både *O. acuformis* och *O. yallundae* gynnas av hög luftfuktighet och en temperatur under 20° vid tillväxt i växten (Ramanauskienė *et al.*, 2016, Olvång & Twengström 2002).

Oculimacula spp. orsakar utvintringsskador och i värsta fall liggsäd via stråknäckning. På angripna plantor kan man se att de yttre bladen börjar vissna vid bladbasen och bladslidan. Ju längre angreppet pågår, desto längre sprider sig *Oculimacula* spp. in i plantan och stryper vatten- och näringstillförseln. Det bildas runda ringar på stråbasen som liknar ögon. Dessa symtom kan lätt förväxlas med angrepp av *Fusarium* spp. och *R. cerealis* (Olvång & Twengström 2002).

För att undvika angrepp av *Oculimacula* spp. gäller det att implementera integrerat växtskydd (IPM). Den kemiska bekämpningen har visat sig svår då *O. acuformis* och *O. yallundae* reagerar olika på olika bekämpningsmedel. Att bekämpa med metyl benzimidazol karbamater (MBC) ger bäst effekt på *O. yallundae* medan *O. acuformis* visat sig mindre påverkad, vilket betyder att val av preparat ger olika effekt i olika fält (Parnell *et al.* 2008). Dessutom har *Oculimacula* spp. bildat resistens mot bekämpningsmedlet demethylation inhibitorer (DMIs) (Ramanauskienė *et al.* 2016).

Effektiva odlingsåtgärder mot sjukdomen är sen sådd, att undvika alltför täta bestånd, lågt ogrästryck, låga kvävegivor, undvika att lämna skörderester kvar i fält och en växtföljd på minst 3 år mellan vete. Vid kemisk bekämpning bör man bekämpa tidigt på säsongen. Kemisk bekämpning av *Oculimacula* spp. har visats ge en viss skördeökning. Det finns en provisorisk bekämpningströskel, som är att bekämpning bör ske om det finns tydliga fläckar och om svampen har växt igenom bladslida nr 2 på minst 20% av grödan i växtstadium DC 31. Angreppsnivåerna minskar under sommaren om det blir torrt väder (Zadoks *et al.* 1974, Olvång & Twengström 2002).

2.1.2 Skarpögonfläck orsakad av *Rhizoctonia cerealis*

Rhizoctonia cerealis är en patogen som blir vanligare i världen. Just i Sverige är klimatet inte optimalt och det har därför inte blivit ett större problem (Hamada *et al.* 2011). Trots det har angreppen ökat i Sverige under de senaste åren (Jordbruksverket u.å.b.).

Svampen trivs bra under hösten då det är fuktiga och kyliga förhållanden och angriper främst höstsäd. *Rhizoctonia cerealis* är en basidiesvamp som är jordburen och övervintrar som antingen mycel eller sklerotier. *Rhizoctonia cerealis* kan infektera grödan under hela säsongen. Svampen producerar sällan sexuella sporer utan sprider sig asexuellt via sklerotier eller mycel. Den kan ligga latent länge, så om man fått in smitta i sina fält är den svår att bli av med. *Rhizoctonia cerealis* kan ha flera olika värdar både ogräs som andra grödor, detta påverkar också hur länge smittan är kvar i fälten och försvåra en god växtföljd. Spridningen av svampen sker via vatten eller jord som förflyttas med exempelvis maskiner. *Rhizoctonia cerealis* trivs i blöta jordar med lågt pH och har ett temperaturoptimum mellan 15 och 22°C (Agrios 2005, Hamada *et al.* 2011).

Symtomen består av ljusa fläckar med mörk kant runt fläcken. Vid kraftigare angrepp blir stråna insjunkna och i värsta fall bryts de av och orsakar liggsäd. Fläckarna sitter högre upp på stråbasen än för stråknäckare.

Rhizoctonia cerealis orsakar skördeminskningar och försämrar kvalitén eftersom svampen hindrar näringstransporten från rötterna till resten av plantan. Ofta är angreppen inte värre än att plantor runt de infekterade plantorna kan kompensera för skördeförlusten. På grund av detta bekämpas sjukdomen sällan i Sverige och någon tydlig bekämpningströskel finns inte (Jordbruksverket u.å.b).

I Kina förekommer kraftiga angrepp med stora skördeförluster. De använder sig av fungiciderna Validamycin och Fludioxonil. Tidigare har det även använts MBC, men det ger ingen effekt utan gynnar *R. cerealis* då konkursen från andra svampar minskar. För att minska spridningen och angreppen av *R. cerealis* finns det några förebyggande åtgärder, såsom växtföljd, sen sådd och att använda sig av direktsådd. Då svampen är jordburen och känslig för torka har direktsådd visat sig vara effektivt då sklerotierna inte klarat sig i det övre jordlagret där det blir torrt och varmt (Hamada *et al.* 2011).

2.1.3 Stråbasröta orsakad av *Fusarium* spp.

Fusarium spp. är ett stort släkte av svampar som kan infektera många grödor och olika delar av växter. *Fusarium pseudograminearum*, *Fusarium culmorum* och *Fusarium graminearum* infekterar olika sädesslag och orsakar stråbasröta, men kan också infektera axet och bilda axfusarios.

Många arter i släktet *Fusarium* kan reproducera sig sexuellt. Inuti perithecier bildas asci med ascosporer. Sporerna sprider sig med vinden och infekterar plantor genom naturliga öppningar. När plantan är infekterad sprider sig svampen genom xylemet i plantan till mitten av strået (Trail 2009).

För att sprida sig asexuellt produceras konidier. Konidierna ser olika ut beroende på *Fusarium*-art. De bildas på redan infekterade växtdelar och sprids sedan med vattenstänk. Patogenen övervintrar framförallt som mycel i gamla skörderester. Det är främst skörderester och infekterat utsäde som orsakar stråbasröta (Hörberg 2001).

Symtomen av stråbasröta består av bruna fläckar av nekros och även bleka fläckar (Kazan & Gardiner 2018). Fläckarna sitter nära stråbasen på strået eller bladslidan. Vid kraftiga angrepp blir strået insjunket och kan få en rosa-orange nyans (Hörberg 2001).

Fusarium spp. orsakar skada både i form av skördeförluster, men främst på grund av att svampen producerar olika mykotoxiner i växten. Ett exempel är toxinet deoxynivalenol (DON) och zearalenon (ZEN) som blir ett allt större problem för både human konsumtion och foder. För höga halter av olika mytoxiner gör att skörden inte går att äta. Vid angrepp på stråbaser som sedan blir halm kan hög toxinnivåer av främst ZEN leda till missfall hos grisar (Fogelfors 2015).

För kemisk bekämpning av *Fusarium* spp. finns det få alternativ i Sverige. Proline och Prosaro har viss effekt men endast under en kortare period och är främst effektivt mot axfusarios och inte på stråbasröta. Ingen bekämpningströskel finns för stråbasröta.

Bästa bekämpningsmetoden är att använda sig av IPM, dvs friskt utsäde, ta bort skörderester i jorden och använda en växtföljd med varierade grödor, inte sädesslag eller majs för regelbundet. Man kan också anpassa gödslingen så att det inte blir för täta bestånd och ha väl-dränerade jordar så att plantorna inte utsätts för vattenstress (Jordbruksverket u.å.a, Hörberg 2001).

2.1.4 Jämförelse mellan stråbassjukdomar

Om man jämför de fyra olika patogenerna ser man att de har många olikheter och att det är symptomen som gör dem lika. Svamparna har olika typer av spridningsmekanismer och gynnas av olika typer av klimat. De påverkas också av olika former av bekämpning. För att få en bättre översikt och göra en bättre jämförelse har information om varje sjukdom sammanställts i tabell 1.

Tabell 1. Översikt av stråbassjukdomar i höstvete

Sjukdom	Patogen	Division	Smittoväg	Gynnsamt klimat	Bekämpningsströskel	Påträffad resistens mot fungicid
Stråknäckare	<i>Oculimacula acuformis</i>	Ascomycota	Luftburen	Fuktigt och kyligt	Tydliga fläckar där svampen har växt igenom bladslida nr 2 på minst 20% av grödan i växtstadium DC 31 ³	MBC och DMIs ¹
Stråknäckare	<i>Oculimacula yallundae</i>	Ascomycota	Luftburen	Fuktigt och kyligt	Samma som <i>O. acuformis</i>	MBC och DMIs ¹
Skarp ögonfläck	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Basmi-diomycota	Jordburen Alternativa värdar	Fuktigt och kyligt	Saknas	Saknas
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> spp.	Ascomycota	Jordburen Utsädesburen Skörderester	Fuktigt	Saknas	Reducerad effekt på 50% med Proline och Prosaro ²

¹(Parnell et al. 2008, Ramanauskienė et al. 2016), ²(Jordbruksverket u.å.a),³ (Olvång & Twengström 2002).

2.2 Okulär diagnostisering jämfört med molekylär detektion

Okulär diagnostisering består av identifiering med hjälp av de synliga symptom som finns på stråbaserna. En sådan diagnos blir beroende av att personen som utför diagnostiseringen har ett tränat öga.

Den molekylära diagnosen består av en DNA extraktion följt av till exempel PCR-reaktion eller annan molekylär detektionsmetod (Vincelli & Tisserat 2008). Resultatet från den molekylära diagnosen är positivt om patogenen kan detekteras. Då den molekylära diagnosen ofta används som facit bör man ha i åtanke att det kan bli fel även där. Primrarna kan påverka beroende på hur artspecifika primrar man använder, både mellan och inom arter. En molekylär diagnostisering kan användas för att upptäcka latent smitta. En latent smitta syns inte när man gör en okulär diagnostisering vilket kan leda till ett ej överensstämmande resultat.

En okulär diagnos bygger på de synliga symtomen, detta kan visa sig vara ett problem om man har fält som har mycket latent smitta. Ett fält kan ha angrepp som inte har hunnit utveckla sig och ge symptom. En molekylär diagnos ger utslag på latent smitta. Detta kan göra att man kan bekämpa ett fält innan sjukdomen har hunnit sprida sig för mycket eller göra för stor skada (Turner *et al.* 1999). I en rapport av Turner *et al.* (1999) gjorde de en liknade studie där de använde sig av PCR för att detektera *Microdochium nivale*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *R. cerealis* och *O. aciformis* och *O. yallundae* i fält av höstvet. De jämförde smittonivån med 4 veckors intervall och noterade hur symtomen utvecklades för att undersöka hur olika växtstadium påverkar okulära diagnostisering. Deras slutsats var att det är svårt att göra en bra okulär diagnos innan stadie DC 30 (Zadoks *et al.* 1974).

3 Material och metoder

3.1 Diagnostisering av stråbassjukdomar

3.1.1 Provmaterial

Det här arbetet är baserat på 78 höstveteprover från jordbruksverkets växtskyddscentraler i Alnarp (Skåne) och Uppsala (Uppland). Fältet från Skåne betecknas som 150 och fältet från Uppland betecknas som B177. Från fält 150 kommer 38 prover av höstvete. Från fältet i Uppland kommer 40 prover (tabell 2). Proverna från de två fälten har diagnostiserats okulärt av olika personer.

Tabell 2. Grundinformation om fälten varifrån prover samlats in

Fält	Region	Lokal	Sort	Förfrukt	Förfrukt	Jordbearbetning	Jordart	Datum för okulär diagnos
Fält B177	Uppsala	Torslunda	Julius	Höstvete	Höstraps	Ej plöjt på flera år	Lätt-lera	17-07-17
Fält 150	Alnarp	Gärnäs	Praktik	Höstvete	Höstvete	Plöjt	mmh lätt-lera	17-07-10

3.1.2 Väderförhållanden under odlingssäsongen

Vintern mellan 2016/2017 var mild och torr (SMHI 2018b). Våren 2017 växlade mycket mellan varmt och kallt. Det kom sparsamt med nederbörd i större delarna av Sverige. Gärnäs (fält 150) fick mer nederbörd

än Torslunda (fält B177) (SMHI 2017). Sommaren var torr, speciellt i Uppland. Temperaturmässigt var det en vanlig svensk sommar (SMHI 2018a).

3.2 Okulär identifiering av sjukdomssymtom

Proverna blev okulärt diagnostiserade med olika typer av skalor beroende på sjukdom. Stråna graderades i juli (tabell 2) och var kring DC stadie 70 (Zadoks *et al.* 1974). Varje strå diagnostiserades individuellt för i undersökningen inkluderade sjukdomar. Graderingen för *Oculimacula* spp. bedömdes enligt följande: 0: inget symtom, 1: symtom utgör mindre än halva stråets omkrets, 2: symtom på mer än halva omkretsen och 3: insjunket strå. Starkt angrepp räknades som insjunket strå för *Fusarium* spp. och insjunket strå eller många fläckar för *R. cerealis*.

3.3 Molekylär detektion

Den laborativa delen bestod av tre delar; DNA extraktion, PCR och elektrofores. DNAextraktionen gjordes med hjälp av E.Z.N.A.® Plant DNA Extraction kit för växtmaterial (Omega Bio-Tek, Norcross, GA USA). Till DNAextraktionerna klipptes stråbaserna av 2 cm nedanför den första noden och 1 cm högre upp om det fanns tydliga fläckar. Proverna klipptes i millimeterstora bitar ner i skruvlocksror med en mutter i botten och en ovanpå provmaterialet. Rören skakades på 5000 rpm i 30 sekunder för att finfördela proverna. Då proverna blivit ett fint pulver blandades de med 800 µl SP1 buffer blandat med 2 µl RNase och skakades ytterligare en gång på 5000 rpm i 30 sekunder. Sedan följdes instruktionerna för extraktionskitet: E.Z.N.A.® Plant DNA Extraction kit. Rören värmdes på 65°C i 10 minuter. 200 µl SP2 buffert tillsattes innan proverna fick vila på is i 5 minuter och sedan centrifugeras med 6,3 g i 10 minuter. Vätskan i proverna pipetterades över till nya kolonner och resterna av proverna sparades i -20°C. Kolonnerna centrifugerades i 2 minuter med 6,3 g och vätskan överfördes till nya 2 ml Eppendorf-rör. För att rena DNAt användes 900 µl

SP3 buffert, 650 µl SPW buffert och nya kolonner med upprepad centrifugering i 1 minut med 6,3 g. För att extrahera DNA ur kolonnerna tillsattes 35µl elutionsbuffert i två omgångar som centrifugerades med 6,3 g i 1 minut. DNAextraktionerna sparades i -20°C.

Koncentrationen på proverna mättes med Nanodrop spektrofotometer (ND-1000 Spectrophotometer, Saveen Werner). Samtliga prover späddes därefter till 2 ng/µl med ultrarent vatten.

De spädda proverna användes till PCR. PCR-reaktionen bestod av 10 µl PCR-mix och 10µl DNA-prov. I PCR-mixen var koncentrationen µl 0,2 µM primer både forward och reverse primer, 2,75 mM MgCl₂, 0,025 U µl⁻¹ DreamTaq® DNA Polymerase (Fermentas International Ink, Kanada) ,10X DreamTaq™ Green Buffer, 0,2 mM dNTP och milliQ-vatten. PCR-programmet varierade beroende på vilken art som skulle identifieras och därmed vilka primrar som användes (tabell 3). För att identifiera *Oculimacula* spp. användes ett PCR-program med 2 minuter på 95°C, 35 cykler med 95°C i 30s, 60°C i 30s, 72°C i 30s, följt av 72°C i 2 minuter. För de övriga arterna användes ett PCR-program med 2 minuter på 95°C, 35 cykler med 95°C i 30s, 55°C i 30s, 72°C i 30s och därefter 72°C i 2 minuter.

Tabell 3. Primrarna använda till PCR

Artnamn	Namn	Sekvens
<i>Oculimacula yallundae</i>	<i>O. yallundae</i> Walsh 2005 F	5' – GGG GGC TAC CCT ACT TGG CAG - 3'
<i>Oculimacula yallundae</i>	<i>O. yallundae</i> Walsh 2005 R	5'- ATT CAA GGG TGG AGG TCT GRA -3'
<i>Oculimacula acufornis</i>	<i>O. acufornis</i> Walsh 2005 F	5'- GCC ACC CTA CTT CGG TAA -3'
<i>Oculimacula acufornis</i>	<i>O. acufornis</i> Walsh 2005 R	5'-ATT CAA GGG TGG AGG TCT GRA - 3'
<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> sp. Strausbaugh 2005	5'- TGG CGA GGC TGA GCA AAG -3'
<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium</i> sp. Strausbaugh 2005	5' – GCG CAT CGA GAA TTT GCA -3'
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	<i>R. cerealis</i> Nicholson 1996 F	5'- AAA ACT GGC AACC CT TGG TG -3'
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	<i>R. cerealis</i> Nicholson 1996 R	5'- TAA CTC ACC ACT CCA GCC GTT -3'

För att se vilka prover som amplifierats och därmed innehöll DNA från respektive patogen, användes elektrofores. Gelen bestod av 1% agaros, 0,01 µl/ml Nancy-250 BDA och SB-buffert. 5 µl PCR-produkt

pipetterades ner i varje brunn och 3µl GR-mix (stege) pipetterades i de yttersta brunnarna. Gelen genomgick en elektrofores på 187V i 55 minuter. När elektroforesen var klar togs bilder med hjälp av UV-ljus och foton skrevs ut för att senare kunna analyseras. Varje PCR-reaktion och elektrofores utfördes två gånger för att bekräfta resultaten.

Primrarna (tabell 3) som användes är utvecklade för qPCR, vilket syns på resultatet då alla amplikon är relativt korta, ca 100 baspar, utom *R. cerealis*, vars amplikon är 800–900 baspar. De prover som bedömdes som positiva hade tydliga band vid rätt längd.

3.4 Statistik analys

Proverna hade innan laborationen fått en okulär diagnos med olika graderingar. Det laborativa resultatet bestod inte av någon gradering, utan av ett positivt eller negativt resultat. Positivt resultat betyder att respektive svamps DNA detekterades med hjälp av DNAanalys. Som icke överensstämmande räknas varje strå för sig och avviker ett enda resultat räknas hela strået som icke överensstämmande även om en av de andra sjukdomarna är korrekt identifierat okulärt.

På resultatet utfördes en korstabellsanalys och Pearson χ^2 -test. Korstabellsanalysen jämför de olika resultaten för att se korrelationen mellan variablerna. χ^2 -test används sedan för att utvärdera hur troligt det är att något av resultaten i korstabellsanalysen uppkom av en slump (Olsson *et al.* 2005).

Nollhypotesen var att den okulära diagnosen inte hade något samband med den molekylära diagnosen.

4 Resultat

4.1 Stråknäckare orsakad av *Oculimacula* spp.

Oculimacula spp. består av två arter, och en ej överensstämmande diagnostisering har räknats om det fanns en okulär diagnostisering, men inget positivt band på varken *O. yallundae* eller *O. acuformis*. Alternativt om det fanns positiva resultat från den molekylära diagnosen, men inga okulära symtom noterats (tabell 4, bilaga 1 tabell 8 och 9). Ett positivt resultat för *O. yallundae* och *O. acuformis* hade tydliga och starka band.

Tabell 4. Jämförelse av resultat, okulär och molekylär diagnostisering av *Oculimacula* spp

Fält	U. Fält B177	S. Fält 150
Antal strån med symtom för <i>Oculimacula</i> spp.	28	38
Antal positiva resultat med PCR för <i>O. yallundae</i>	27	9
Antal positiva resultat med PCR för <i>O. acuformis</i>	26	28
Antal överensstämmande resultat för <i>Oculimacula</i> spp.	32	28
Antal överensstämmande resultat för <i>O. yallundae</i>	29	9
Antal överensstämmande resultat för <i>O. acuformis</i>	28	28
Positiv okulär + positiv molekylär för <i>Oculimacula</i> spp.	26	28
Positiv okulär + positiv molekylär för <i>O. yallundae</i>	22	9
Positiv okulär + positiv molekylär för <i>O. acuformis</i>	21	28
Positiv okulär + negativ molekylär <i>Oculimacula</i> spp.	2	10
Positiv okulär + negativ molekylär <i>O. yallundae</i>	6	29
Positiv okulär + negativ molekylär <i>O. acuformis</i>	7	10
Negativ okulär + positiv molekylär <i>Oculimacula</i> spp	6	0
Negativ okulär + positiv molekylär <i>O. yallundae</i>	5	0
Negativ okulär + positiv molekylär <i>O. acuformis</i>	5	0
Negativ okulär + negativ molekylär <i>Oculimacula</i> spp.	6	0
Negativ okulär + negativ molekylär <i>O. yallundae</i>	7	0
Negativ okulär + negativ molekylär <i>O. acuformis</i>	7	0
Icke överensstämmande resultat i % för <i>Oculimacula</i> spp.	20%	26%

De icke överensstämmande resultaten mellan okulär- och molekylär diagnostisering presenteras i procent och baseras på en korstabellsanalys. I korstabellanalysen slogs *O. acutiformis* och *O. yallundae* ihop, då den okulära detektionen endast identifierar stråknäckare och inte kan skilja mellan svamparterna. Utifrån kortabellsanalysen utfördes ett χ^2 -test. För fält B177 stämde den okulära- och molekylära diagnosen överens ($p=0,0019$), vilket indikerar en relativt korrekt okulär diagnos. Fältet hade 32 korrekta diagnostiseringar (tabell 4).

4.2 Skarp ögonfläck orsakad av *Rhizoctonia cerealis*

Den okulära diagnosen stämde bra överens med den molekylära diagnosen från fälten i Upplands län, fält B177 (tabell 5, bilaga 1 tabell 8 och 9). Fältet B177 från Skåne län hade färre positiva prover än väntat, baserat på den molekylära diagnostiseringen jämfört med den okulära diagnosen. Generellt var *R. cerealis* den sjukdom för vilken graderade symtom överensstämde bäst med den molekylära diagnostiseringen.

Tabell 5. Jämförelse av resultat från okulär och molekylär diagnostisering av *Rhizoctonia cerealis*

Fält	U. Fält B177	S. Fält 150
Antal strån med symtom för <i>R. cerealis</i>	0	14
Antal positiva resultat med PCR för <i>R. cerealis</i>	1	9
Antal överensstämmande resultat för <i>R. cerealis</i>	39	31
Positiv okulär + positiv molekylär för <i>R. cerealis</i>	0	8
Positiv okulär + negativ molekylär för <i>R. cerealis</i>	0	6
Negativ okulär + positiv molekylär <i>R. cerealis</i>	1	1
Negativ okulär + negativ molekylär <i>R. cerealis</i>	39	23
Icke överensstämmande resultat i %	3%	18%

Då fält B177 endast hade negativa prover på den okulära diagnostiseringen gick ett χ^2 -testet ej att utföra. För fält 150 stämde den okulära och molekyllära detektionen överens ($p=0,0005$). Endast ett strå hade positivt resultat efter den molekyllära diagnosen och därav en ej överensstämmande diagnostisering i endast 3%.

4.3 Stråbasröta orsakad av *Fusarium* spp.

Den okulära diagnosen av *Fusarium* spp. stämde inte överens med den molekyllära detektionen, då inget av proverna visade positivt i den molekyllära analysen (tabell 6). Resultatet från den molekyllära diagnosen gav inga positiva resultat, detta gjorde att det inte var möjligt att göra en korstabellssanalys eller χ^2 -test.

Tabell 6. Jämförelse av resultat från okulär och molekyllär diagnostisering av *Fusarium* spp.

Fält	U. Fält B177	S. Fält 150
Antal strån med symtom för <i>Fusarium</i> spp.	7	15
Antal positiva resultat med PCR för <i>Fusarium</i> spp.	0	0
Antal överensstämmande resultat	0	0
Positivt okulär + positiv molekyllär <i>Fusarium</i> spp.	0	0
Positiv okulär + negativ molekyllär <i>Fusarium</i> spp.	7	15
Negativ okulär + positiv molekyllär <i>Fusarium</i> spp.	0	0
Negativ okulär + negativ molekyllär <i>Fusarium</i> spp.	33	23
Icke överensstämmande resultat i %	18%	39%

4.4 Jämförelse mellan de olika sjukdomarna och diagnosmetoderna

En överensstämmande gradering för de olika sjukdomarna beror på hur många okulära- och molekylära diagnoser som stämde överens. De undersökta fälten kommer från två olika län. I tabell 7 och i bilaga 1, tabell 8 och 9 syns skillnaderna på hur de olika diagnosmetoderna stämmer överens i fälten som helhet. De okulära graderingarna stämde inte helt överens med den molekylära diagnosen. En överstämmande gradering för ett strå har alla sjukdomarna rätt diagnostiserade. Till en icke överensstämmande gradering räknas alla strån som inte överensstämmer på alla sjukdomarna. I tabell 8 och 9 i bilaga 1 ser man att *R. cerealis* inte har blandats ihop med de andra sjukdomarna i någon större grad. Däremot kan man se att vissa strån som har graderats som *Fusarium* spp. har diagnostiserats med *Oculimacula* spp. i den molekylära analysen, främst i fält B177.

I tabell 7 ser man i procent hur många av diagnostiseringarna som inte stämde överens både inom fälten som helhet och för sjukdomarna för sig. Ju lägre procent desto bättre stämde den okulära- och molekylära diagnosen överens.

Tabell 7. Jämförelse för båda fälten mellan okulär och molekylär diagnostisering för alla sjukdomar.

Fält	U. Fält B177	S. Fält 150
Icke överensstämmande resultat i % alla sjukdomar	28%	63%
Icke överensstämmande resultat i % <i>Oculimacula</i> spp.	20%	26%
Icke överensstämmande resultat i % <i>R. cerealis</i>	3%	18%
Icke överensstämmande resultat i %. <i>Fusarium</i> spp.	18%	39%

5 Diskussion

Syftet med arbetet var att jämföra okulär gradering med molekylär detektion av stråbassjukdomar. Den okulära diagnosen var olika mellan patogen och fält. Fälten ligger i olika regioner med olika sjukdomstryck och klimat.

5.1 Pearsons χ^2 - test och jämförelse mellan okulär och molekylär detektion

Ett χ^2 -test och en korstabellsanalys utfördes på resultaten. Nollhypotesen, att det inte fanns något samband mellan den okulära diagnosen och den molekylära diagnosen, kunde förkastas för både *Oculimacula* spp. och *R. cerealis*. För *Oculimacula* spp. i fält B177 stämde den okulära- och molekylära detektionen överens ($p=0,0019$). För *R. cerealis* stämde detektionerna överens ($p=0,0005$) i fält 150. För *Fusariums* spp. var det sämre överensstämmelse. Där fanns det inga positiva diagnostiseringar i den molekylära delen, varken i fält 150 eller B177. För *Fusariums* spp. kunde nollhypotesen alltså inte förkastas, även om χ^2 -test inte kunde beräknas.

Trots att den okulära- och molekylära detektionen stämde överens för både *R. cerealis* och *Oculimacula* spp. fanns det många diagnostiseringar som inte stämde överens. Det är det resultatet som kommer diskuteras i diskussionen.

De olika patogenerna har symtom som liknar varandra, speciellt *Oculimacula* spp. och *R. cerealis*. Båda ger upphov till runda fläckar som liknar ögon och insjunket strå (Jordbruksverket u.å.b, Olvång & Twengström 2002). Trots det verkar de inte ha blandats ihop i den okulära diagnosen. I fält B177 noterades ingen skarp ögonfläck och i

den molekylära diagnosen visade endast ett prov positivt resultat för *R. cerealis*. I fält 150 var det 18% icke överensstämmande för *R. cerealis*, och jämfört med *Fusarium* spp. och *Oculimacula* spp. stämde *R. cerealis* okulära diagnos bäst.

Oculimacula spp. identifierades här med hjälp av två arts specifika analyser, en för vardera *O. yallundae* och *O. acuformis*. I fält är symtomen för de båda svamparna samma, så en okulär diagnostisering här är inte möjlig för de två arterna separat, utan endast för *Oculimacula* spp. som släkte. *Oculimacula yallundae* hade ett högre sjukdomstryck i fältet i Uppsala regionen (fält B177) än i Skåne (fält 150; tabell 4, bilaga 1 tabell 8 och 9). Detta beror troligtvis på fältvariation. Den okulära diagnosen jämfört med den molekylära diagnosen har tydligast samband för *O. acuformis* i fält 150. Det beror troligen på att den hade störst förekomst ute i fält. Samma samband syns inte i fält B177.

Fusarium spp. detekterades inte i den molekylära diagnosen, men graderades som symptom i den okulära (tabell 6, bilaga 1 tabell 8 och 9). Det ledde till en överdiagnostisering på 39% i fält 150 och 18% i fält B177, vilket kan bero på att symtomen av *Fusarium* spp. förväxlats med *Microdochium* spp. som båda ger liknande symptom (Hörberg 2001). När laborationen utfördes testades inte *Microdochium* spp. då det i tidigare liknande försök inte gett några positiva resultat (Edin¹ pers. comm). I detta fall hade det eventuellt gett utslag för en del av proverna som visade symptom för *Fusarium* spp. Primrarna för *Fusarium* spp. var inte artanpassade utan utvecklade för ett artkomplex av *Fusarium* spp. Det betyder att analysen inte kunde påvisa *Fusarium* spp. från proverna från fälten då primrarna täcker in flera *Fusarium* arter.

5.2 Över- och underdiagnostisering

Om klimatet blir varmare och vintrarna mildare kommer stråbassjukdomarna gynnas och då potentiellt utgöra ett större problem. I de norra delarna av Europa kan kemisk bekämpning därför komma att bli viktigare för att minska skador från angrepp av stråbassjukdomar då de antas komma få större betydelse.

¹ Eva Edin, Hushållningssällskapet, 2019-03-27

Över- eller underdiagnostisering av symtom i fält kan ha olika orsaker. I fälten som undersökts visade resultaten på en överdiagnostisering, främst i fält 150. Detta kan bero på att ett symtom orsakat av en patogen kan se ut som flera olika sjukdomar, och om insjunket strå eller nekros är några av symtomen kan de bero på andra sjukdomar som inte undersökts i detta arbete, till exempel *Microdochium* spp. Skador som nekros eller insjunket strå kan också orsakas av fysiologiska skador.

En konsekvens av överdiagnostisering är att det kan leda till onödig kemisk bekämpning, men även att bekämpningströsklar bestäms felaktigt. En underdiagnostisering däremot leder till minskad skörd i de fall kemisk bekämpning inte används eller utförs i tid. Flera av patogenerna har börjat utveckla resistens mot fungicider, bl.a. MBC och därför bör fungicider användas strategiskt (Parnell *et al.* 2008). Då MBC har en viss påverkan på *Oculimacula* spp. men ingen på *R. cerealis* bör den användas sparsamt då resistens redan uppkommit i vissa fall hos *Oculimacula* spp. (Hamada *et al.* 2011, Parnell *et al.* 2008).

I Sverige bekämpas sällan stråbassjukdomar med fungicider. De svenska skördetrösklarna bygger på gamla försök och utförda med sorter känsliga mot stråbassjukdomar, och de behöver uppdateras eller skapas i de fallen det inte finns (tabell 1). Det behöver även utredas om förekomsten av stråbassjukdomar har ett samband med skörde-minskning eller försämrad kvalitet av skörden. Vilka sorter som är känsliga för stråbassjukdomar och om symtomen är lättare att diagnostisera på olika sorter är också intressant. En skördetröskel bör baseras på samma detektionsmetod som lantbrukaren kommer att använda sig av i fält. Dock finns det enligt denna rapports resultat risk för överdiagnostisering vid användandet av en molekylär diagnos. Att basera en bekämpningströskel på endast en okulär diagnostiseringsmetod kommer att leda till en underdiagnostisering i fält då vissa symtom inte är färdigutvecklade och det kan förekommer latent smitta som gör det svårt att bedöma hela angreppet. För att göra en tillförlitlig skördetröskel bör båda metoderna kombineras för att få ett användbart redskap för lantbrukare och rådgivare.

Okulär identifiering av symtom är snabbt och lätt tillhands ute i fält medan den molekylära oftast tar längre tid och kostar mer pengar. Det finns utvecklade molekylära metoder för en snabbare detektion, men de är dyrare än den okulära diagnostiseringen. När fönstret för kemisk

bekämpning är litet och det tar tid för symtomen att visa sig, som för *Oculimacula* spp., kan det finnas för lite tid för den typ av molekylär diagnos som använts här, eftersom prover då måste skickas till ett laboratorium.

Andra problem med en molekylär diagnostisering är att den måste vara tillräckligt känslig och fungera väl. I denna studie användes primrar hämtade från Strausbaugh *et al.* 2005, Walsh *et al.* 2005 och Nicholson & Parry 1996. De är anpassade efter liknande klimat och populationer. Primrar utvecklade för *Oculimacula* spp. i andra världsdelar kanske inte kan detektera den svenska populationen av *Oculimacula* spp. om det finns en inomartsvariation hos arterna. Andra faktorer som kan påverka den molekylära diagnosen är kvalitén och koncentrationen av DNA i proverna. Är det för låg eller hög DNA koncentration i proverna eller om extraktionen av någon anledning misslyckats, kan det vara svårt att få ett tydligt resultat. Samtidigt, för att utveckla en okulär diagnostiseringsmetod behöver man vara säker på vilka symptom patogenerna ger upphov till. Att först göra en okulär och sedan en molekylär diagnos är ett bra sätt att lära sig se skillnad på de olika symtomen.

Metoden som användes för molekylär diagnos i detta arbete kan detektera att smitta finns i ett strå, men inte hur allvarlig infektionen är. Den okulära diagnosen ger en osäkrare diagnos, men man kan se hur ett fält mår som helhet. Ingen av diagnosmetoderna kan i sig förutsäga om angreppets påverkan på skörden.

5.3 Svagheter med undersökningen

Arbetet här har utförts på samma sätt som två tidigare försök (Berlin² pers.comm, Edin³ pers. comm). Prover med okulär diagnos har kommit från växtskyddscentraler och de har fått en molekylär diagnos och molekylär detektion av patogenerna har utförts för att jämföra med den okulära diagnosen. I de tidigare försöken har prover även

² Anna Berlin, Inst. Skoglig mykologi och växtpatologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, 2019-03-25

³ Eva Edin, Hushållningssällskapet, 2019-03-27

undersökts för förekomst av *Microdochium* spp. (Berlin⁴ pers.comm). När *Fusarium* spp. inte gav något positivt resultat på den molekylära diagnosen bör en ny PCR med *Microdochium* spp. göras för att kontrollera om den okulära *Fusarium* spp. diagnosen egentligen orsakats av *Microdochium* spp. Om *Fusarium* spp. hade detekterats hade det även varit intressant med artspecifika primrar. Proverna som användes hade varit torkade i ett år vilket kan påverka DNA-kvaliteten i proverna.

Att fälten är diagnostiserade av två olika personer är både bra och dåligt. Det ger en bild av hur olika den okulära diagnosen kan vara trots att båda fälten har blivit undersökt av personer med liknande erfarenhet. Hade det varit samma person som genomfört båda de okulära diagnoserna hade jämförelsen mellan sjukdomssymtomen på olika sorter blivit mer relevant. Om så varit fallet hade man kunnat jämföra hur vädret och sorten påverkade de synliga symtomen.

I de tidigare analyserna har den molekylära diagnostiseringen genomförts av erfaren personal som har mer erfarenhet av att både använda sig av DNA extraktion och PCR-analyser. Både den okulära analysen och den molekylära analysen behöver tolkas och ju mer erfarenhet man har desto bättre tolkning är troligt.

5.4 Slutsats

Syftet med rapporten var att jämföra okulär diagnostisering med molekylär diagnostisering. Slutsatsen är att de två metoderna inte alltid stämmer överens. Den molekylära diagnosen kan ge en mer specifik diagnos, medan en okulär ger en bra översiktlig diagnos. Att kombinera de två diagnoserna ger det mest tillförlitliga resultatet.

⁴ Anna Berlin, Inst. Skoglig mykologi och växtpatologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, 2019-03-25

Referenslista

- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. 5th ed. San Diego: Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50017-8>
- Fogelfors, H. (red.) (2015). *Vår mat: odling av åker- och trädgårdsgrödor: biologi, förutsättningar och historia*. 1. uppl. Lund: Studentlitteratur.
- Hamada, M.S., Yin, Y., Chen, H. & Ma, Z. (2011). The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat. *Pest Management Science*, vol. 67 (11), ss. 1411–1419. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.2236>
- Hutzenlaub, N. (2010). *Assessment of Soil Suppressiveness. The system of fusarium foot rot on wheat*. (Masterarbete). Swedish University of Agricultural Sciences. Tillgänglig: <https://stud.epsilon.slu.se/2076/>
- Hörberg, H. (2001). *Fusarium-svampar i stråsäd*. (Faktablad om växtskydd. Jordbruk, 103 J). Uppsala. Tillgänglig: https://www.slu.se/globalassets/ew/org/inst/ekol/faktablad/faktablad-vaxtskydd/faktablad_om_vaxtskydd_103j.pdf [2019-06-10]
- Jordbruksverket (u.å.a). *Axfusarios Vete. Växtskyddsinfo*. Tillgänglig: https://fou.jordbruksverket.se/vxinfo/mobil/answer_skade.php?ogras_id=0458 [2019-06-04]
- Jordbruksverket (u.å.b). *Skarp ögonfläck vete. Växtskyddsinfo*. Tillgänglig: https://fou.jordbruksverket.se/vxinfo/mobil/answer_skade.php?ogras_id=0601 [2019-04-11]
- Jordbruksverket (u.å.c). *Stråknäckare vete. Växtskyddsinfo*. Tillgänglig: https://fou.jordbruksverket.se/vxinfo/mobil/answer_skade.php?ogras_id=0452 [2019-04-11]
- Kazan, K. & Gardiner, D.M. (2018). Fusarium crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum* in cereal crops: recent progress and future prospects: Fusarium crown rot of cereals. *Molecular Plant Pathology*, vol. 19 (7), ss. 1547–1562. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12639>
- Nicholson, P. & Parry, D.W. (1996). Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat. *Plant Pathology*, vol. 45 (5), ss. 872–883. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1996.tb02898.x>
- Olsson, Ulf et al. (2005) *Biometri: grundläggande biologisk statistik*. Lund: Studentlitteratur.
- Olvång, H. & Twengström, E. (2002). *Stråknäckare*. (Faktablad om växtskydd. Jordbruk, 17 J). Uppsala. Tillgänglig: https://www.slu.se/globalassets/ew/org/inst/ekol/faktablad/faktablad-vaxtskydd/faktablad_om_vaxtskydd_17j.pdf [2019-04-11]
- Parnell, S., Gilligan, C.A., Lucas, J.A., Bock, C.H. & Bosch, F.V.D. (2008). Changes in fungicide sensitivity and relative species abundance in *Oculimacula yallundae* and *O. acuformis* populations (eyespot disease of cereals) in Western Europe. *Plant Pathology*, vol. 57 (3), ss. 509–517. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01786.x>
- Ramanauskienė, J. & Gaurilčikienė, I. (2016). Incidence of eyespot in winter wheat and quantification of the fungi *Oculimacula acuformis* and *O. yallundae* in Lithuania. *Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 123 (2), ss. 75–81. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0013-4>
- SMHI (2017). *Våren 2017 - Torr och variationsrik vår*. Tillgänglig: <http://www.smhi.se/klimat/klimatet-da-och-nu/arets-vader/varen-2017-torr-och-variationsrik-var-1.115486> [2019-06-02]

- SMHI (2018a). *Sommaren 2017 - Typisk svensk sommar*. Tillgänglig:
<http://www.smhi.se/klimat/klimatet-da-och-nu/arets-vader/sommaren-2017-meteorologi-1.123378> [2019-06-02]
- SMHI (2018b). *Vintern 2017 - Mild och torr men nederbördsrik i fjällen*. Tillgänglig:
<http://www.smhi.se/klimat/klimatet-da-och-nu/arets-vader/vintern-2017-meteorologi-1.114921> [2019-06-02]
- Strausbaugh, C.A., Overturf, K. & Koehn, A.C. (2005). Pathogenicity and real-time PCR detection of *Fusarium* spp. in wheat and barley roots. *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 27 (3), ss. 430–438. DOI:
<https://doi.org/10.1080/07060660509507242>
- Turner, O'hara, Rezanoor, Nuttall, Smith & Nicholson (1999). Visual disease and PCR assessment of stem base diseases in winter wheat. *Plant Pathology*, vol. 48 (6), ss. 742–748. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00407.x>
- Vincelli, P. & Tisserat, N. (2008). Nucleic Acid–Based Pathogen Detection in Applied Plant Pathology. *Plant Disease*, vol. 92 (5), ss. 660–669. DOI:
<https://doi.org/10.1094/PDIS-92-5-0660>
- Walsh, K., Korimbocus, J., Boonham, N., Jennings, P. & Hims, M. (2005). Using Real-time PCR to Discriminate and Quantify the Closely Related Wheat Pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula acuformis*. *Journal of Phytopathology*, vol. 153 (11–12), ss. 715–721. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01045.x>
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. & Konzak, C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, vol. 14 (6), ss. 415–421. DOI:
<https://doi.org/10.1111/j.13653180.1974.tb01084.x>

Tack

Jag vill tacka mina handledare Anna Berlin, Björn Andersson och Eva Edin. De har hjälpt mig med både laborationer och uppsatsskrivande. De har svarat på alla mina frågor med tålamod och goda råd. Jag vill även tacka mina klasskamrater som man kan gå och klaga till när det känns svårt.

Bilaga 1 – Tabeller över jämförelsen av de okulär och molekyllära resultaten

Tabeller över resultaten för fält 150 Skåne och B177 Uppsala

Tabell 8. Översikt av jämförelsen av den okulära och molekyllära diagnostiseringen för fält 150 Skåne. 1 strå för positivt resultat

Srå	150	Stråknäckare	Oy	Oa	Fusarium	Fusarium	R. cerealis	R. cerealis
		Okulär	Molekyllär	Molekyllär	Okulär	Molekyllär	Okulär	Molekyllär
1501		1	1	1			1	1
1502		1	1	1			1	1
1503		1	1	1	1			
1504		1	1	1			1	1
1505		1	1	1				
1506		1	1	1	1			
1057		1	1	1				
1508		1	1	1	1		1	1
1509		1		1				
15010		1		1	1			
15011		1		1			1	1
15012		1		1	1		1	1
15013		1		1			1	
15014		1		1			1	
15015		1		1				
15016		1		1	1			
15017		1	1	1	1			
15018		1		1				
15019		1		1	1			
15020		1		1				
15021		1		1	1			
15022		1		1				
15023		1		1			1	
15024		1			1		1	1
15025		1			1			
15026		1			1			
15027		1						
15028		1						1
15029		1					1	1
15030		1		1				
15031		1						
15032		1		1	1			
15035		1			1			
15036		1			1			
15037		1		1				
15038		1		1			1	
15039		1					1	
15040		1		1			1	
Totalt		38	9	28	15	0	14	9

Tabell 9. Översikt av jämförelsen av den okulära och molekyllära diagnostiseringen för fält B177 Uppsala. 1 står för positivt resultat

B177	Stråknäckare	O,y	O,a	Fusarium	Fusarium	R. cerealis	R. cerealis
Strå	Okulär	Molekyllär	Molekyllär	Okulär	Molekyllär	Okulär	Molekyllär
T1							
T2							
T3							
T4		1	1				1
T5		1	1				
T6				1			
T7		1		1			
T8		1	1	1			
T9				1			
T10				1			
T11			1	1			
T12		1	1	1			
T13	1	1	1				
T14	1	1	1				
T15	1	1	1				
T16	1	1	1				
T17	1	1	1				
T18	1						
T19	1	1					
T20	1		1				
T21	1	1					
T22	1						
T23	1		1				
T24	1	1	1				
T25	1	1	1				
T26	1	1					
T27	1	1	1				
T28	1	1	1				
T29	1		1				
T30	1	1	1				
T31	1	1	1				
T32	1	1	1				
T33	1	1	1				
T34	1	1	1				
T35	1	1	1				
T36	1		1				
T37	1	1	1				
T38	1	1	1				
T39	1	1					
T40	1	1					
Total:	28	27	26	7	0	0	1